

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 30 DEC. 2003

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

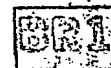
BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*03

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE page 1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

19 50V, 20 202

Réservé à l'INPI

REMISE DES PIÈCES

DATE 27 DEC 2002

DELL 75 INPI PARIS

N° D'ENREGISTREMENT

0216785

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE

27 DEC. 2002

PAR L'INPI

Vos références pour ce dossier

(facultatif) 240277 D20881 NT

☒ NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

Cabinet REGIMBEAU

20, rue de Chazelles

75847 PARIS CEDEX 17

FRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie

☐ N° attribué par l'INPI à la télécopie

☒ NATURE DE LA DEMANDE

Cochez l'une des 4 cases suivantes

Demande de brevet

☒

Demande de certificat d'utilité

☐

Demande divisionnaire

☐

Demande de brevet initiale

N°

Date

ou demande de certificat d'utilité initiale

N°

Date

Transformation d'une demande de

☐

brevet européen *Demande de brevet initiale*

N°

Date

☒ TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

Poudres de phosphates de calcium biocompatibles pour des matériaux implantables

☒ DÉCLARATION DE PRIORITÉ
OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE
LA DATE DE DÉPÔT D'UNE
DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

☐ S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»

☒ DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)

☐ Personne morale

☒ Personne physique

Nom
ou dénomination sociale

FRAYSSINET, Patrick

Prénoms

Forme juridique

N° SIREN

Code APE-NAF

Domicile

ou

siège

Rue

Code postal et ville

Pays

Le Gaillard, Route de St-Thomas, 31470 SAINT LYS

FRANCE

Française

Nationalité

N° de téléphone (facultatif)

Adresse électronique (facultatif)

N° de télécopie (facultatif)

☒ S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»

Remplir impérativement la 2^{ème} page

reçu le 14/01/03



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*01

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

REMISE DES PIÈCES DATE _____ LIEU _____ N° D'ENREGISTREMENT 0216785 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE 27-12-2002 PAR L'INPI		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE Cabinet REGIMBEAU 20, rue de Chazelles 75847 PARIS CEDEX 17 FRANCE	
Vos références pour ce dossier (facultatif) 240253 D20847 NT			
Confirmation d'un dépôt par télécopie <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie			
2 NATURE DE LA DEMANDE Demande de brevet Demande de certificat d'utilité Demande divisionnaire <i>Demande de brevet initiale</i> <i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i> Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i>		Cochez l'une des 4 cases suivantes <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> N° _____ Date _____ N° _____ Date _____ N° _____ Date _____	
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) PARTICULES ET CERAMIQUES DE PHOSPHATES DE CALCIUM POUR TRANSFECTION IN VIVO ET IN VITRO			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases) Nom ou dénomination sociale _____ Prénoms _____ Forme juridique _____ N° SIREN _____ Code APE-NAF _____ Domicile ou siège Rue _____ Code postal et ville _____ Pays _____ Nationalité _____ N° de téléphone (facultatif) _____ Adresse électronique (facultatif) _____		<input type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique FRAYSSINET, Patrick _____ _____ Le Gaillard, Route de St-Thomas, 31470 SAINT LYS FRANCE Française N° de télécopie (facultatif) _____	
<input checked="" type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»			

Réservé à l'INPI

REMISE DES PIÈCES

DATE

27 DEC 2002

LIEU

75 INPI-PARIS

N° D'ENREGISTREMENT

0216785

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DB 540 07 210002

MANDATAIRE (N° de l'agent)		240277 + E19710 NT
Nom		
Prénom		
Cabinet ou Société		Cabinet REGIMBEAU
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		
Adresse	Rue	20, rue de Chazelles
	Code postal et ville	75847 PARIS CEDEX 17
	Pays	
N° de téléphone (facultatif)		01 44 29 35 00
N° de télécopie (facultatif)		01 44 29 35 99
Adresse électronique (facultatif)		info@regimbeau.fr
INVENTEUR (S) Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques		
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input checked="" type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)
RAPPORT DE RECHERCHE Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)		
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Paiement échelonné de la redevance (en dix versements)		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un acte de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence): AG
SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS		<input type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences
Le support électronique de données est joint		<input type="checkbox"/>
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		<input type="checkbox"/>
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		1

**SIGNATURE DU DEMANDEUR
OU DU MANDATAIRE**
(Nom et qualité du signataire)

92 1169 

**VISA DE LA PRÉFECTURE
OU DE L'INPI**



REMISE DES PIÈCES DATE LIEU		Réservé à l'INPI	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		02 16 78 5 27-12-2002	
6 MANDATAIRE (s'il y a lieu) Nom Prénom Cabinet ou Société N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel Adresse : Rue Code postal et ville Pays N° de téléphone (facultatif) N° de télécopie (facultatif) Adresse électronique (facultatif)		240253 NT Cabinet REGIMBEAU 20, rue de Chazelles 75847 PARIS CEDEX 17 01 44 29 35 00 01 44 29 35 99 info@regimbeau.fr	
7 INVENTEUR (S) Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques <input checked="" type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)	
8 RAPPORT DE RECHERCHE Établissement immédiat ou établissement différé		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation) <input checked="" type="checkbox"/> Établissement immédiat <input type="checkbox"/> Établissement différé	
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence). AG	
10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS Le support électronique de données est joint La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		<input type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences <input type="checkbox"/>	
Si vous avez utilisé l'imprimé « Suite », indiquez le nombre de pages jointes		1	
11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI	



1 bis, rue de Saint Pétersbourg
93800 Paris Cedex 08
téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*02

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Page suite N°

3 / 3

BR/SUITE

REMISE DES PIÈCES

DATE

LIEU

27 DEC 2002

75 INPI-PARIS

N° D'ENREGISTREMENT

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

0216785

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08-629-W / 011001

Vos références pour ce dossier (facultatif) : 240277 + E19710 NT

☒ DÉCLARATION DE PRIORITÉ
OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE
LA DATE DE DÉPÔT D'UNE
DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE

Pays ou organisation

Date N°

Pays ou organisation

Date N°

Pays ou organisation

Date N°

☒ DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)

☐ Personne morale

☒ Personne physique

Nom
ou dénomination sociale

ROUQUET, Nicole

Prénoms

Forme juridique

N° SIREN

Code APE-NAF

Domicile
ou
siège

Rue

15, rue Auguste Conte, 31400 TOULOUSE

Code postal et ville

Pays

FRANCE

Française

Nationalité

N° de téléphone (facultatif)

N° de télécopie (facultatif)

Adresse électronique (facultatif)

☒ DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)

☐ Personne morale

☐ Personne physique

Nom
ou dénomination sociale

Prénoms

Forme juridique

N° SIREN

Code APE-NAF

Domicile
ou
siège

Rue

Code postal et ville

Pays

Nationalité

N° de téléphone (facultatif)

N° de télécopie (facultatif)

Adresse électronique (facultatif)

☒ SIGNATURE DU DEMANDEUR
OU DU MANDATAIRE
(Nom et qualité du signataire)

921169

Nant

VISA DE LA PRÉFECTURE
OU DE L'INPI

[Signature]

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI

reçue le 14/01/03



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75200 Paris Cedex 08

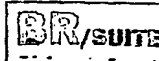
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 26 54

BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



REQUÊTE EN DÉLIVRANCE



Page suite N° 3 / 3

RESEAU DES PIÈCES DATE _____ LIEU _____		Reservé à l'INPI	
N° D'INREGISTREMENT 02 16 78 3		NATIONAL ATTRIBUE PAR L'INPI 27-12-2002	
Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire		INVENTION (L'INVENTION)	
Vos références pour ce dossier (facultatif)		240253 NT	
<input checked="" type="checkbox"/> DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation _____ Date _____ N° _____ Pays ou organisation _____ Date _____ N° _____ Pays ou organisation _____ Date _____ N° _____	
<input checked="" type="checkbox"/> DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale _____		ROUQUET, Nicole	
Prénoms _____		_____	
Forme juridique _____		_____	
N° SIREN _____		_____	
Code APE-NAF _____		_____	
Domicile ou siège	Rue	15, rue Auguste Conte,	
	Code postal et ville	31400 TOULOUSE	
	Pays	FRANCE	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif) _____		_____	
N° de télécopie (facultatif) _____		_____	
Adresse électronique (facultatif) _____		_____	
<input checked="" type="checkbox"/> DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale _____		_____	
Prénoms _____		_____	
Forme juridique _____		_____	
N° SIREN _____		_____	
Code APE-NAF _____		_____	
Domicile ou siège	Rue	_____	
	Code postal et ville	_____	
	Pays	_____	
Nationalité		_____	
N° de téléphone (facultatif) _____		_____	
N° de télécopie (facultatif) _____		_____	
Adresse électronique (facultatif) _____		_____	
<input checked="" type="checkbox"/> SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) _____		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI	

- 5 La présente invention se rapporte à une méthode de fixation d'ADN à la surface de phosphates de calcium de caractéristiques particulières. Cette méthode peut comporter une étape de maturation du matériau dans une solution saline pour améliorer la fixation d'ADN et sa disponibilité pour la transfection de cellules. L'invention porte également sur l'utilisation des poudres et céramiques de phosphates de calcium modifiées pour la
- 10 transfection de cellules *in vitro* et *in vivo* et pour la culture de cellules transfectées en réseau tridimensionnel.

- La transfection de gènes dans les cellules eucaryotes est une étape clef de la thérapie génique. Plusieurs méthodes sont utilisables avec des rendements variables. Elles sont
- 15 utilisables *in vitro* ou *in vivo*.

- A des fins de thérapie géniques, les cellules peuvent être transfectées *in vitro* puis réinjectées dans l'organisme ou bien transfectées directement dans les organes ou les tissus dans lesquels elles résident (Evans, C.H., Robbins, P.D., Possible orthopaedic
- 20 applications of gene therapy, J Bone Joint Surg, 77-A, 7 : 1103-1114)

Les différentes méthodes utilisées pour la transfection cellulaire sont résumées dans le tableau ci-dessous :

Méthode	Avantages	Inconvénients
DEAE-dextran	Simple	Expression transitoire
Phosphate de calcium	Simple	Inutilisable pour cellules en suspension
Liposomes	Simple	Relativement non prouvé
Micro-injection	Efficace	Techniquement difficile
Electroporation	Bon pour les cellules non	Pas de co-transfection

	adhérentes	
Fusion de protoplastes	Bon pour les cellules non adhérentes	Résultats variables
Adénovirus	Forte infectivité, production inconnue, infecte les cellules ne se divisant pas, grande variété de cellules hôtes	ADN intégrés comme épisode, toxique, production de protéines virales
Adénovirus associés	Non pathogènes, Expression stable, infecte les cellules ne se divisant pas, grande variété de cellules hôtes	Supporte seulement des gènes courts, difficile à produire, peu développé
Herpès simplex	Infecte les cellules ne se divisant pas, supporte des gènes longs, Efficace	Toxique, expression transitoire, peu développé
Infection par retrovirus		Type cellulaire réduit par le tropisme, capacité de codage basse,
Solides polycationiques	Simple, transfection localisée	Expression transitoire
Chromosome satellite	Permet de transfecter des gènes longs	Résultats non prouvés

Depuis une quinzaine d'années qu'ont débuté les essais cliniques de thérapie génique, les résultats ont été dans l'ensemble décevant pour plusieurs raisons :

- 5 Quels que soient les vecteurs utilisés, adénovirus, virus associé à l'adénovirus (AAV), rétrovirus ou formulation physico-chimiques, l'efficacité de transfert des gènes dans les cellules cibles a toujours été très faible (A. Kahn. Dix ans de thérapie génique: déceptions et espoirs. *Biofutur* 202:16-21, 2000). La durée d'expression des transgènes thérapeutiques est la plupart du temps brève, limitée à quelques semaines, en raison
- 10 d'une réaction immune qui provoque l'élimination préférentielle des cellules transduites, de la longévité intrinsèque de celles-ci ou de l'extinction des séquences d'ADN ou promoteurs qui dirigent l'expression des gènes insérés (Orkin, S.H., Motulsky, A.G., report and recommendations of the panel to assess the NIH investment in research gene therapy. www.nih.gov/news/panelrep.html).

Enfin certains vecteurs ont manifesté un effet toxique. Des accidents sont survenus lors d'utilisation de vecteurs adénoviraux injectés dans l'organisme ayant entraîné la mort de patients dans des essais de traitement par l'ornithine transcarbamylase (Smaglik, P.,

Investigators ponder what went wrong after gene therapy death. The Scientist 13 [21] :1 (1999).

Ainsi, il ressort de l'analyse de tous les essais cliniques de thérapie génique que la stratégie de transfert d'un gène nécessiterait des vecteurs beaucoup plus performant, plus sûrs et capables de transfecter préférentiellement les cellules sur lesquelles un effet thérapeutique est nécessaire (Orkin, S.H., Motulsky, A.G., report and
10 recommendations of the panel¹ to assess the NIH investment in research gene therapy. www.nih.gov/news/panelrep.html).

C'est pour cette raison que des vecteurs polymériques polycationiques ont été développés. Ces vecteurs sont des solides et peuvent adsorber de l'ADN sous
15 différentes formes, en particulier, sous forme de plasmide. Ils ont la particularité de transfecter les cellules qui arrivent à leur contact avec un rendement variable. Ils ont été utilisés *in vivo* pour transfecter des cellules des tissus conjonctifs lâches intervenant dans la cicatrisation osseuse afin d'accélérer cette dernière (S. Goldstein and J. Bonadio. *in vivo* gene transfer methods for wound healing. The Regent of the
20 University of Michigan. Anonymous. United States:(5,962,427):1-31, 1999. thérapie génique. A61K 48/00. 514/44).

Les coprécipités de phosphates de calcium et d'ADN ont été utilisés depuis de nombreuses années afin de transfecter les cellules *in vitro* (E. T. Schenborn and V. Goiffon. Calcium phosphate transfection of mammalian cultured cells. edited by M. J. Tymms, Totowa, NJ:Humana Press Inc, 2000, p. 135-144; W. Song and D. K. Lahiri. Efficient transfection of DNA by mixing cells in suspension with calcium phosphate. *Nucleic Acid Research* 23 (17):3609-3611, 1995; Y.-W. Yang and J.-C. Yang.

Calcium phosphate as a gene carrier: electron microscopy. *Biomaterials* 18:213-217; (1997).

5 Ils sont obtenus en versant une solution de chlorure de calcium dans le milieu afin de le sursaturer en calcium et de précipiter un phosphate de calcium dans lequel sont incluses des molécules d'ADN. Ces particules composites sont ensuite phagocytées par les cellules qui intègrent le plasmide de différentes manières et expriment les gènes qui sont transportés.

10 Cependant, ces coprécipités ont un inconvénient majeur. Ils sont très difficilement utilisables *in vivo* car il est difficile d'obtenir une sursaturation en système ouvert. D'autre part, ils ne peuvent permettre des transfections localisées dans l'espace.

15 Les céramiques de phosphates de calcium sont des matériaux obtenus par frittage d'une barbotine contenant des particules de phosphate de calcium en suspension. Ce sont des assemblages de grains liés par des joints de grains (Frayssinet, P., Fages, J., Bonel, G., Rouquet, N., *Biotechnology, material sciences and bone repair. European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology* (1998) 8: 17-25).

20 Ces matériaux présentent une biocompatibilité particulière avec le tissu osseux, ce qui les rend particulièrement utiles comme matériau de reconstruction osseuse ou bien comme vecteur de cellules ostéogéniques (P., Frayssinet, J.L. Trouillet, N. Rouquet, E. Azimus, A. Autefage (1993), *Osseointegration of macroporous calcium phosphate ceramics having a different chemical composition. Biomaterials*, 14, 6: 423-429).

25

Dans le cadre de l'invention, nous avons développé des poudres et des céramiques de phosphate de calcium capables de transfecter des cellules à la fois *in vivo* et *in vitro*, notamment des cellules mésenchymateuses. La composition chimique de ces céramiques peut varier car plusieurs sels de l'acide orthophosphorique peuvent rentrer dans leur composition, en particulier, le phosphate tricalcique, l'hydroxyapatite qui est

30

- la phase de synthèse la plus proche de la phase minérale du tissu osseux, et le phosphate octocalcique. Ces céramiques ont une autre particularité, elles ont des propriétés de surface très variables en fonction de différents paramètres tels que, parmi d'autres, le mode de synthèse de la poudre, la température de cuisson, ou la présence de divers éléments traces. Ces différents facteurs influent en particulier sur la charge de surface, le potentiel zeta et les capacités de substitution dans la maille du phosphate de calcium. Les céramiques phosphocalciques ont également la particularité de présenter des croissances épitaxiales d'apatite carbonatée à leur surface une fois implantées dans l'organisme ou immergées dans un milieu salin de composition comparable au liquide extracellulaire (M. Heughebaert, R. Z. LeGeros, M. Gineste, and A. Guilhem. Hydroxyapatite (HA) ceramics implanted in non-bone-forming sites. Physico-chemical characterization. *J Biomed Mat Res* 22:257-268, 1988). C'est à ces croissances cristallines qu'ont été attribuées les propriétés de biocompatibilité de ces matériaux.
- 15 Les propriétés d'adsorption des phosphates de calcium vis-à-vis des acides nucléiques ont été mises à profit en chromatographie sur colonnes d'HA pour séparer et purifier l'ADN ou certains ARN. Il est essentiel de comprendre que, à composition chimique égale, toutes les poudres d'hydroxyapatite utilisées en chromatographie n'ont pas le même pouvoir séparateur des acides nucléiques (A. Eon-Duval, Purification of plasmid DNA by hydroxyapatite chromatography, Abstract of 2nd conference on hydroxyapatite. San Francisco March 2001). Les interactions entre les molécules organiques et l'hydroxyapatite dépendent des propriétés de surface de ce mineral (M.J. Gorbunoff, Protein chromatography on hydroxyapatite columns. *Methods in Enzymology*, vol 182, Academic Press Inc 1985 : 329-339), qui peuvent varier d'un lot
- 20 à l'autre.
- 25

Il a été prouvé que la distribution des charges à la surface du solide et ses capacités d'hydratation ont une influence importante sur l'adsorption des molécules organiques à sa surface (Norde, W., Lyklema, J., (1991) Why proteins prefer interfaces. *J Biomed*

Sci Polymer Edn 2, 183-202 (1991)). De même, la force ionique, et le pH du solvant des molécules organiques doivent être pris en compte.

Si la protéine en solution et le solide ont une charge opposée, ils s'attirent. Au moins si la charge de la protéine et celle de la surface du solide se compensent grossièrement. Si les charges ne se compensent pas, cela résulte en une accumulation de charges dans la région de contact causant un haut potentiel électrostatique, énergétiquement peu favorable à une adsorption. Une situation similaire est observée lorsque la surface du solide et la molécule organique sont de même signe. Néanmoins, dans de nombreux cas, l'adsorption peut se faire tout de même dans certains cas grâce à l'incorporation d'ions de la solution à l'interface de la couche adsorbée qui prévient l'accumulation de charge.

L'hydrophobie a une influence sur l'adsorption car elle participe à la répartition des charges en particulier dans les molécules organiques qui ont une structure tertiaire et quaternaire. L'hydrophobie d'une surface (molécule ou bien solide) peut favoriser l'adsorption.

La répartition des charges ainsi que les capacités d'hydratation des apatites sont des propriétés intéressantes car elles peuvent avoir une charge de surface positive ou négative et peuvent être hydrophiles ou hydrophobes. De plus, les substitutions dans la maille pouvant être nombreuses, les groupes fonctionnels à la surface peuvent varier.

Nous avons développé des poudres de phosphates de calcium à base d'hydroxyapatite capables de fixer de l'ADN sous différentes formes et de le délivrer à des cellules isolées ou dans l'organisme à des fins de transfection. Ces poudres peuvent être injectés en suspension dans un liquide ou bien un gel. Elles peuvent également être déposées à la curette ou bien servir de vecteur transfectant à des cellules cultivées en réseau tridimensionnel. Elles ont des propriétés physico-chimiques particulières afin de

posséder ces propriétés de transfection. Une série d'expérimentation a été menée permettant de juger la transfection de cellules isolées ou non avec un plasmide porteur du gène de la galactosidase pouvant être mis en évidence par histochimie. La poudre est une mise en forme particulièrement bien adaptée pour pouvoir transfecter à la fois des cellules isolées ou des tissus.

Le mécanisme intervenant dans la fixation d'ADN (molécule organique de charge négative) à la surface de particules d'hydroxyapatite peut-être :

- Une adsorption électrostatique lorsque le matériau est de charge positive
- Une coprécipitation des molécules d'ADN dans la couche d'apatite carbonatée apparaissant par croissance épitaxiale à la surface de ces matériau et résultant de processus de dissolution/reprécipitation complexes se déroulant à la surface dans des milieux sursaturés en calcium et phosphore.
- Un échange ionique entre la phase interfaciale et la solution

L'ADN une fois fixé sur le matériau doit pénétrer dans la cellule. La composition et les caractéristiques de surface sont également importants pour la dégradation du matériau en milieu biologique et l'émission de particules transfectantes. On sait que les céramiques d'HA se dégradent aux joints de grains et que la couche d'apatite carbonatée apparaissant à la surface du matériau par croissance épitaxiale a une solubilité différente du matériau lui-même.

En revanche, tous les phosphates de calcium ne peuvent transfecter des cellules. Le DCPD par exemple ou bien certaines mises en forme d'HA ou de TCP ont montré leur incapacité à le faire. Leur cytotoxicité est certainement responsable de ceci.

Au contraire, la modification de la surface des poudres et des céramiques par maturation dans un milieu de culture entraînant une croissance épitaxiale d'apatite carbonatée améliore le rendement de marquage.

Description

5

Ainsi, dans un premier aspect, la présente invention se rapporte à un procédé pour modifier la surface des poudres et des céramiques de phosphates de calcium, caractérisé en ce qu'il comprend une étape consistant en une maturation dans un milieu de culture entraînant une croissance épitaxiale d'apatite carbonatée à la surface
10 desdites poudres et céramiques. Cette modification de surface permet d'améliorer le rendement de transfection d'acide nucléique *in vivo* et *in vitro*.

Ces particules de phosphates de calcium sont immergées dans un milieu de culture du type des milieux de culture cellulaire couramment employées en biotechnologie,
15 notamment le DMEM, pendant environ quelques minutes, par exemple 1, 5, 10 ou 30 minutes au moins à environ 12, 24, 48 heures, quelques jours ou davantage à une température allant de 15 à 50°C, de préférence environ 37°C. Le but est d'avoir la formation d'une couche d'apatite carbonatée à la surface avant ou pendant la mise en contact avec les plasmides.

20 Dans un mode de réalisation particulier, le procédé mentionné ci-dessus est réalisé avant la mise en contact avec les acides nucléiques, notamment des plasmides.

Alternativement, cette étape entraînant une croissance épitaxiale d'apatite carbonatée à la surface desdites poudres et céramiques est réalisée dans un milieu contenant les acides nucléiques. Dans ce mode, la modification de surface et la fixation des acides
25 nucléiques sont réalisées simultanément.

De préférence, les poudres et céramiques sont immergées dans un milieu de culture DMEM pendant 48 heures à 37°C avant ou simultanément à la fixation des acides nucléiques.

Dans un aspect complémentaire, l'invention porte sur un procédé de fixation d'acide nucléique, en particulier d'ADN, à la surface de phosphates de calcium ou de céramiques de phosphates de calcium comprenant une étape a) consistant en une hydratation de la poudre de phosphate de calcium ou de la céramique de phosphate de calcium et une étape b) consistant en une immersion des produits obtenus à l'étape a) dans une solution de tampon phosphate contenant un ADN simple ou double brin pour des durées variables de quelques minutes à plusieurs heures, par exemple 1, 5, 10 ou 30 minutes au moins à environ 12, 24, 48 heures ou davantage à une température allant de 15 à 50°C, de préférence environ 37°C.

10 Dans ce procédé, l'hydratation réside de préférence en une immersion de la poudre de phosphate de calcium ou de la céramique de phosphate de calcium dans une solution simulant les fluides extracellulaires destinée à produire une croissance épitaxique d'apatite carbonatée à la surface desdites poudres et céramiques.

Les étapes a) et b) peuvent être effectuées simultanément ou successivement. Ainsi, on peut mettre en œuvre l'invention avec une solution contenant un ADN simple ou double brin pour des durées variables de quelques minutes à plusieurs heures à environ 37°C.

Avantageusement, ce procédé permet de fixer l'ADN à pH physiologique sur des particules de phosphate de calcium. Les céramiques peuvent être des céramiques poreuses ou denses.

Dans un autre aspect, l'invention porte sur les poudres et les céramiques de phosphates de calcium susceptibles d'être obtenues à partir du procédé décrit ci-dessus, caractérisées en ce qu'elles peuvent supporter une croissance épitaxique d'apatite carbonatée à leur surface.

L'invention vise également les poudres et les céramiques de phosphates de calcium possédant une croissance épitaxiale d'apatite carbonatée à leur surface et comprenant en outre les acides nucléiques fixés à leur surface.

5 Ces produits sont particulièrement efficaces pour la transfection de cellules *in vitro* et *in vivo*.

Avantageusement, les poudres et céramiques obtenues possèdent au moins l'une des propriétés décrites ci-après :

- 10 - Nature des groupes chargés à la surface : PO_4^- , OH^- , Ca^{++}
- pH de surface basique
 - Potentiel électrocinétique négatif
 - Hydrophobe
 - granulométrie comprise entre 0-200 μm , en particulier entre 80-125 μm et 0-25 μm .

15

De préférence, les produits de l'invention comprennent l'ensemble des caractéristiques décrites ci-dessus.

En outre, les poudres et céramiques de phosphates de calcium mentionnées ci-dessus
20 peuvent comporter un noyau composé d'un autre matériau polymérique, céramique ou métallique, de préférence magnétique.

L'invention vise également les particules formées à base de poudres de phosphates de calcium décrites ci-dessus, lesdites particules étant comprises dans une matrice
25 minérale ou polymérique, en particulier dans des ciments de phosphate ou de sulfate de calcium.

Dans un autre aspect, l'invention se rapporte à un revêtement de céramiques de prothèses articulaires ayant les caractéristiques de la céramique définie ci-dessus.

L'invention vise également l'utilisation desdites poudres et céramiques de phosphate de calcium possédant une croissance épitaxiale d'apatite carbonatée à leur surface comme support pour la culture cellulaire, notamment pour la culture en réseau tridimensionnel de cellules transfectées par le support et pour la transfection de cellules *in vitro* et *in vivo*.

Les exemples suivants sont donnés à titre illustratif. Ils constituent des modes de réalisations préférés de l'invention.

Exemple 1 : Caractéristique des poudres utilisées

15

Type P15: poudre sphérique de surface spécifique 0,62 m²/g. Elles ont été calcinées à 1180°C et leur granulométrie est comprise entre 80-125 µm.

Type P1: poudre de forme quelconque de surface spécifique 56,84 m²/g, non calcinée (brute) de granulométrie comprise entre 0-25 µm.

20

L'étude granulométrique des poudres utilisées montre que les poudres sphériques (P15) ont une tranche granulométrique bien définie alors que celles de forme quelconque (P1) a des tranches granulométriques beaucoup plus larges avec beaucoup de particules fines. Le pH de charge nulle varie avec la température de calcination des poudres. Le potentiel zéta de la poudre P1 mesuré dans de l'eau déminéralisée est de -27,5 mV et le pH de surface est de 9,08.

25

En fonction de la température de frittage de la poudre, le pH de charge nul est variable mais largement inférieur au pH physiologique. Ceci signifie que quelque soit la

température de frittage, le potentiel électrocinétique des poudres, au pH neutre, est négatif.

- 5 L'examen en microscopie à balayage des poudres sphériques montre qu'elles sont constituées par des grains assemblés par des joints de grains. Il existe des irrégularités de surface sur certaines des faces des grains à fort grossissement.

Poudre	P1	P15
Nature des groupe chargés	$\text{PO}_4^{--}, \text{OH}^-, \text{Ca}^{++}$	$\text{PO}_4^{--}, \text{OH}^-, \text{Ca}^{++}$
Potentiel électrocinétique (mV)	-27,5	-35
Hydrophobicité	+	+
PH de surface	9,8	7,8
Granulométrie (μm)	0-25	80-125
Surface spécifique (m^2/gr)	56,84	0,62
pH de charge nul		
Forme des poudre	anguleuse	sphérique

10 Exemple 2 : Méthode de fixation de l'ADN sur le vecteur

Le vecteur peut être utilisé de deux manières différentes :

- 15 **Méthode A :** Il peut être incubé directement avec le plasmide dans une solution de tampon phosphate. Il est alors maintenu en contact avec celui-ci pendant plusieurs heures alors que sa surface est modifiée par croissance épitaxiale d'apatite carbonatée. La fixation peut alors se faire par coprécipitation à la surface du matériau.

- 20 **Méthode B :** Il peut également être mis en présence d'une solution saline pendant plusieurs jours afin de modifier la surface. Une fois que celle-ci est équilibrée, le matériau est ensuite mis dans la solution contenant le plasmide. La fixation de l'ADN est supposée se faire alors à la surface de la couche épitaxiale.

Fixation du plasmide sur la surface des particules natives (méthode A):

L'ADN double brin a une affinité marquée pour l'HA lorsqu'il est dissous dans des faible concentration de tampon phosphate. Ils sont élués dans des concentrations supérieures de tampon phosphate. 1 m² de surface de poudre a été disposé dans les

5 boîtes de Pétri soit 1,61 gr pour le type A et 0,017 g dans le type B.

- Hydratation de la poudre d'HA (2ml/g) dans 10ml de tampon phosphate 0,12M. Chauffage 15 à 30 mn à 100°C.

10 ◦ Laisser reposer à température ambiante et sortir le tampon. Re-suspendre dans 5 à 10 ml de 0,12 M de tampon phosphate à 60°C, décanter et resuspendre dans 5 ml du même tampon à 60°C.

- Ajouter l'échantillon de l'acide nucléique dans 1 ml de tampon phosphate 0,12M à 40°C (l'éluion des acides nucléiques doubles brins peut se faire en lavant l'HA 8 à 10 fois avec 0,5 ml de tampon phosphate (0,4M)).

15

Fixation du plasmide à la surface des particules modifiées par croissance épitaxiales (méthode B):

20 ◦ Les particules ont été incubées à 37°C dans du milieu de culture DMEM pendant 48 heures.

- Elles sont lavées dans une solution de tampon phosphate 0,12M
- On ajoute l'échantillon de l'acide nucléique dans 1 ml de tampon phosphate 0,12M à 40°C (l'éluion des acides nucléiques doubles brins peut se faire en lavant l'HA 8 à 10 fois avec 0,5 ml de tampon phosphate (0,4M)).

25

Exemple 3 : Transfection de cellules *in vitro*

Trois lignées ont été utilisées:

- Cartilage de croissance de lapin

- Périoste de lapin
- Cellules de calvaria de rat

Elles sont obtenues en digérant la matrice collagénique dans une solution de collagénase suivie d'une centrifugation.

5

3.1 Matériau à surface non modifiée

La quantité de poudre (type B) a toujours été la même : 10 mg.

Lors de la transfection les cellules n'étaient pas à confluence. Les cellules ont été transfectées à J0 et la première évaluation par histochimie de l'expression de la

10 galactosidase a été faite à J4, J21, J30.

A J4:

Toutes les lignées présentent des zones de marquage. Dans les puits transfectés avec des particules, les cellules marquées sont groupées autour des particules bien que certaines en soient néanmoins éloignées. Cet éloignement peut s'expliquer par le fait

15 que les particules émettent des débris avec une surface spécifique élevée. On les voit au microscope au milieu de groupes de cellules marquées. Cellules de cartilage de croissance: en valeur absolue, c'est la série qui a été la plus marquée.

A J21

En ce qui concerne les cellules de cartilage, le nombre de cellules transfectées est

20 important. Les cellules des calvarias de rats sont fortement positives.

A J30

Les cellules ont une inhibition de contact relative, elles sont quasiment en trois dimensions et arrondies. La plupart des cellules des trois groupes sont positives. Le nombre de cellules positives et le taux de croissance précédent semblent indiquer que

25 les plasmides sont transmis d'une cellule à l'autre ou bien que le relargage de particules d'ADN s'étale dans le temps, le pourcentage de cellules positives aurait été très faible dans le cas contraire. Il est également possible que les relargages de particules transfectantes soient progressifs. Les cellules marquées préférentiellement sont celles au contact des particules.

Pourcentage des cellules marquées en fonction des lignées utilisées :

Temps (jours)	calvaria	Cartilage de conjugaison	périoste
4	15	32	27
21	39	42	35
30	65	71	60

5 3.2 Matériau à surface modifiée par croissance épitaxique

Dès les premiers temps de la culture, la plupart des cellules sont marquées.

3.2.1 Transfection de part et d'autre d'une membrane hémiperméable

Les grains ont été disposés au contact des cellules soit séparés de celles-ci par une
 10 membrane poreuse (0,2µm) en polycarbonate les séparant du tapis cellulaire. Le marquage cellulaire par la galactosidase est évalué par histochimie à J4.

Les cellules en contact direct avec les particules sont marquées sporadiquement. Les cellules qui ne sont pas au contact des particules (séparées par la membrane) sont également marquées. Il existe donc des particules transfectantes de taille inférieure à
 15 0,2 µm passant à travers les pores de la membrane en polycarbonate.

3.2.2 Transfection de cellules en réseau tridimensionnel

Les lignées cellulaires précédemment décrites sont mises en suspension dans le milieu de culture. Le lit est disposé au fond d'une boîte de culture. La suspension sert à
 20 ensemencer un lit de microbilles ($1.5-2 \cdot 10^5$ cellules/0,05 gr de billes) vectrices de plasmides portant le gène la galactosidase. Le lit est disposé au fond d'une boîte de culture. Les cellules sont cultivées 10 à 15 jours. On obtient la formation d'une couche cellulaire tridimensionnelle pontant et agglomérant les billes. Cette couche contient également une matrice collagénique abondante.

A la date d'observation les cellules forment un réseau tridimensionnel pontant les différentes particules et les assemblant. La microscopie optique révèle que les cellules contenues dans l'amas de particules sont marquées par la galactosidase.

3.2.3 Transfection de cellules dans des cultures de tissu

Matériau utilisé pour le marquage: Type A: poudre sphérique de surface spécifique 0,62 m²/g. Elles ont été calcinées à 1180°C et leur granulométrie est 80-125 µm. La quantité de poudre est de quelques dizaines de particules par boîtes (P15).

10

Quelques billes ont été placées au contact des fragments osseux après avoir été incubées sans pré-immersion (méthode A).

Les fragments osseux proviennent de fémurs, tibias et calvaria de rats nouveaux-nés agés de 3 jours. Les pièces osseuses ont été nettoyées des tissus mous attenants. Les os longs ont été coupés en trois morceaux: 2 épiphyses et la diaphyse. Les calvarias ont été coupées en petits fragments de 2 à 3 mm de côté. Ces différents fragments ont été déposés à la surface d'un gel à 3% d'agar dans du DMEM. Le milieu de culture (DMEM+SVF) a été ensuite rajouté de façon à ce que les fragments affleurent à l'interface liquide-air.

20

Les billes ont été maintenues en contact des tissus pendant 2 à 30 jours, date à laquelle l'activité galactosidase des cellules est mise en évidence avant de faire des coupes histologiques.

25

A 2 jours de mise en contact, des zones de marquage sporadiques sont identifiables. Le marquage se fait à distance et au contact des billes d'HA. Il a lieu également au contact de ces mêmes billes.

A 30 jours, la totalité des fragments osseux a viré au bleu macroscopiquement (figure 1).

La figure 1 représente une macrophotographie d'une culture de tissu osseux en présence de poudre transfectante pendant 30 jours. Le fragment osseux est entièrement bleu en raison de la transfection des cellules par le plasmide vecteur de la galactosidase. En microscopie optique par réflexion, il n'est pas possible de voir une zone qui ne soit pas marquée. Les billes sont engluées dans une matrice marquée par la réaction à la galactosidase.

- 10 Les coupes des différents échantillons de tissu osseux cultivés 30j montrent que les cellules osseuses (ostéoblastes, chondroblastes, cellules périchondrales, cellules périostées, ostéoclastes) sont marquées (la figure 2 est une coupe histologique du même tissu montrant que toutes les cellules ont été transfectées par la galactosidase X 30).
- 15 Les cellules des lignées hématopoïétiques ne sont pas marquées. Il faut noter que:
- Toutes les cellules osseuses sont marquées
 - Elles le sont quelle que soit la distance des cellules aux billes.

3.2.4 Transfection in vivo

- 20 Un groupe de 10 lapins males NZW âgés de 4 semaines est sélectionné de manière aléatoire. Ces lapins sont divisés en deux groupes : Lot A et Lot B. Un lapin de chaque groupe sert de témoin.

La zone opératoire se situe sur la mandibule coté gauche en arrière des incisives mandibulaires. Il est à noter qu'une étude préliminaire a permis de sélectionner ce site dans lequel l'os est le plus abondant. Le type de poudre P15 a été utilisé. L'ADN a été fixé par la méthode A.

Après la pose de champs stériles et la désinfection cutanée et muqueuse une incision vestibulaire intrabuccale est réalisée à l'aide d'un bistouri. Un lambeau de pleine

épaisseur est récliné pour accéder à la zone osseuse mandibulaire à la base des incisives. Un trépan de 3mm est utilisé pour systématiser l'effraction osseuse. Le défaut osseux réalisé est de l'ordre de 2 mm de profondeur. Le volet osseux est éliminé à l'aide de ciseau à os. Le biomatériau est aspiré à l'aide d'une seringue de 5 ml et
 5 déposé dans le défaut osseux de telle manière qu'il le remplisse. Une légère pression est utilisée avec une gaze stérile pour maintenir en place le biomatériau. Le lambeau repositionné est ensuite suturé

Deux témoins subissent une deuxième opération controlatérale sans dépose de biomatériau.

- 10 Les lapins ont été sacrifiés à 3 et 6 semaines. Les mandibules ont été prélevées, fixées dans l'éthanol et incluse dans de l'hydroxy-éthylmethacrylate. Des coupes de 5 μ m d'épaisseur ont été réalisées et l'activité galactosidase mise en évidence

• A 3 semaines :

15 *Dans les sites témoins:*

Les coupes histologiques montrent un os spongieux avec peu de trabécules dont les pores sont occupées par un tissu stromal très lâche. Il existe des cellules multinucléées d'allure ostéoclastique à la surface des trabécules. Ces cellules sont toutes marquées par la réaction à la galactosidase. De la même manière, tous les monocytes sont également

- 20 marqués. Ce sont les seules cellules qui sont marquées.

Dans les sites implantés :

Les coupes passant à travers les billes de phosphate de calcium montrent que les billes sont incluses dans un tissu conjonctif relativement dense avec de nombreuses cellules multinucléées à leur surface. Toutes les cellules, fibroblastiques ou multinucléées sont

- 25 marquées par la galactosidase.

Lorsque les coupes s'éloignent des billes, il existe moins de cellules marquées néanmoins les structures tissulaires n'ayant pas été perturbées par l'acte opératoire donnent des informations intéressantes. Les fibroblastes des ligaments dentaires sont marquées. Il existe des îlots de cellules d'aspect fibroblastique marquées dans le tissu

stromal des pores entre les trabécules. Dans certains cas, il semble même que des cellules de la lignée ostéoblastique soient également marqués.

o 6 semaines :

- 5 Macroscopiquement, il existe un marquage autour des grains d'HA. Les coupes montrent des cellules stromales positives.

REVENDEICATIONS

- 5 1. Procédé pour modifier la surface des poudres et des céramiques de phosphates de calcium, caractérisé en ce qu'il comprend une étape consistant en une maturation dans un milieu de culture entraînant une croissance épitaxiale d'apatite carbonatée à la surface desdites poudres et céramiques.
- 10 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que les particules de phosphates de calcium sont immergées dans un milieu de culture du type des milieux de culture cellulaire.
- 15 3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que les particules de phosphates de calcium sont immergées pendant environ quelques minutes à quelques jours.
- 20 4. Procédé selon l'une des revendications 2 et 3, caractérisé en ce que les particules de phosphates de calcium sont immergées à une température allant de 15 à 50°C, de préférence environ 37°C.
5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il est réalisé avant la mise en contact avec les acides nucléiques.
- 25 6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il est réalisé simultanément à la mise en contact avec les acides nucléiques.
7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que l'étape entraînant une croissance épitaxiale d'apatite carbonatée à la surface desdites poudres et céramiques est réalisée dans un milieu contenant les acides nucléiques.

8. Procédé de fixation d'ADN à la surface de phosphates de calcium ou de céramiques de phosphates de calcium comprenant une étape a) consistant en une hydratation de la poudre de phosphate de calcium ou de la céramique de phosphate de calcium et une
- 5 étape b) consistant en une immersion des produits obtenus à l'étape a) dans une solution de tampon phosphate contenant un ADN simple ou double brin pour des durées variables de quelques minutes à plusieurs heures à une température allant de 15 à 50°C, de préférence environ 37°C.
- 10 9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que l'hydratation réside en une immersion de la poudre de phosphate de calcium ou de la céramique de phosphate de calcium dans une solution simulant les fluides extracellulaires destinée à produire une croissance épitaxiale d'apatite carbonatée à la surface desdites poudres et céramiques.
- 15 10. Procédé selon l'une des revendications 8 et 9, caractérisé en ce que les étapes a) et b) sont effectuées simultanément ou successivement.
11. Procédé selon l'une des revendications 8 et 9, caractérisé en ce qu'il permet de fixer l'ADN à pH physiologique sur des particules de phosphate de calcium.
- 20 12. Poudres et céramiques de phosphates de calcium susceptibles d'être obtenues à partir du procédé selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisées en ce qu'elles supportent une croissance épitaxiale d'apatite carbonatée à leur surface.
- 25 13. Poudres et céramiques de phosphates de calcium selon la revendication 12 comprenant en outre les acides nucléiques fixés à leur surface.
14. Poudres et céramiques de phosphates de calcium selon l'une des revendications 12 et 13 caractérisées en ce qu'elles possèdent au moins l'une des propriétés suivantes :

- Nature des groupes chargés à la surface : PO_4^- , OH^- , Ca^{++}
 - pH de surface basique
 - Potentiel électrocinétique négatif
 - Hydrophobe
- 5 - granulométrie comprise entre 0-200 μm , en particulier entre 80-125 μm et 0-25 μm .

15. Poudres et céramiques de phosphates de calcium selon l'une des revendications 12 à 14 caractérisées en ce qu'elles comprennent en outre un noyau composé d'un autre matériau polymérique, céramique ou métallique, de préférence magnétique.

10

16. Particules formées à base de poudres de phosphates de calcium selon l'une des revendications 12 à 15 comprises dans une matrice minérale ou polymérique en particulier dans des ciments de phosphate ou de sulfate de calcium.

15 17. Revêtement de céramiques de prothèses articulaires ayant les caractéristiques de la céramique définie selon l'une des revendications 12 à 15.

18. Utilisation des poudres et céramiques de phosphates de calcium selon l'une des revendications 12 à 15 pour la transfection de cellules *in vitro* et *in vivo*.

20

19. Utilisation des poudres et céramiques de phosphates de calcium selon l'une des revendications 12 à 15 pour la culture de cellules transfectées par le support en réseau tridimensionnel.

25

30

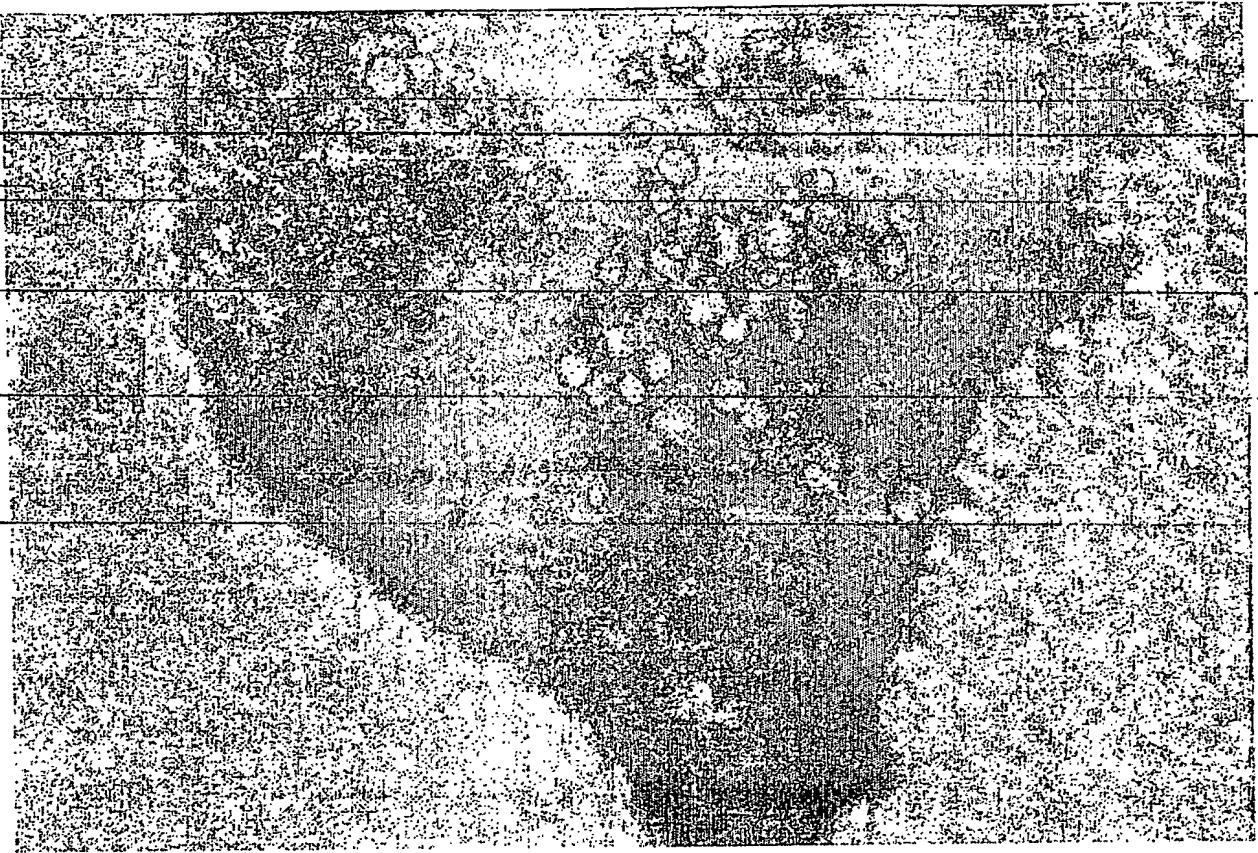


FIGURE 1

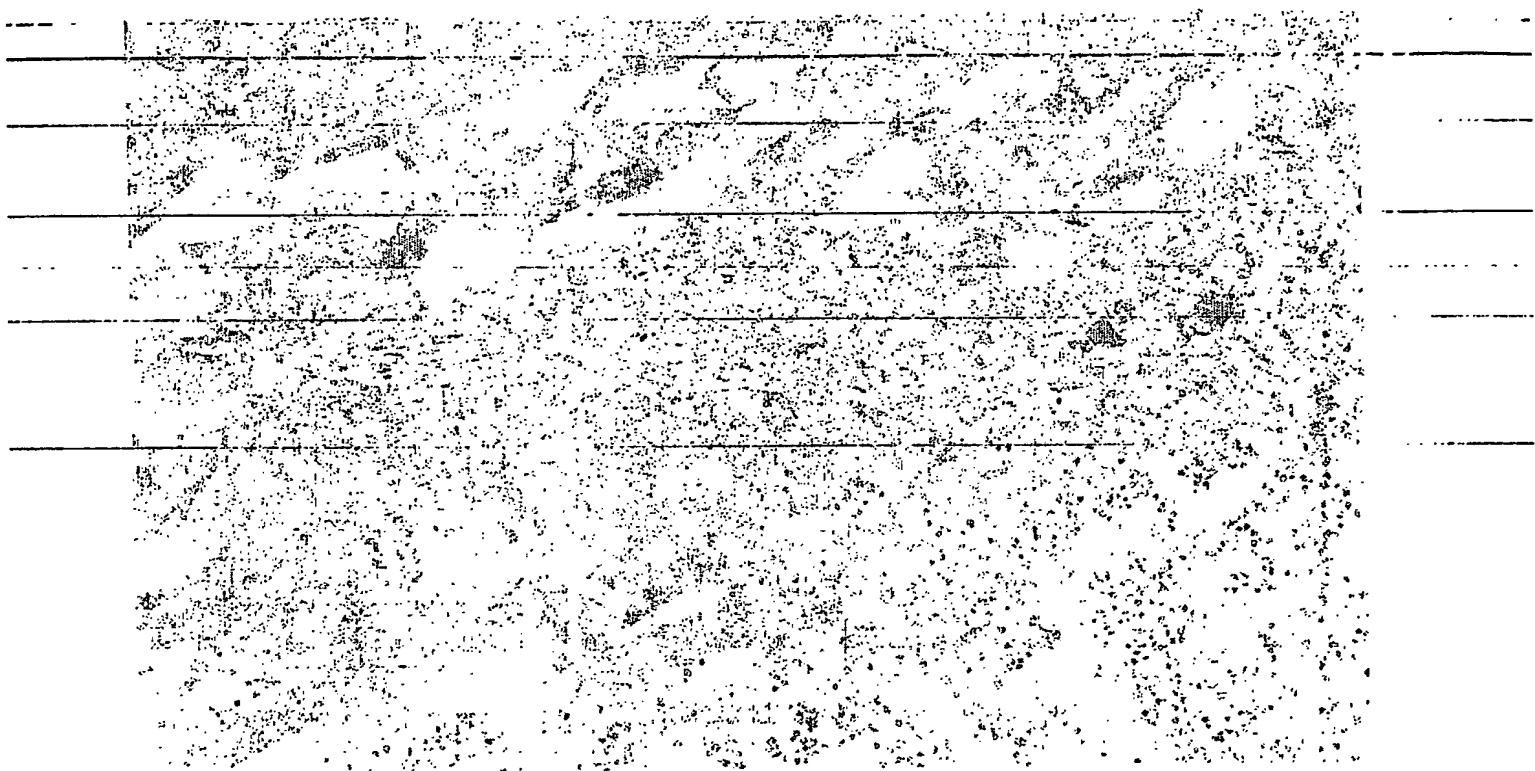


FIGURE 2

PCT/FR2003/003897



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.